Faculté de médecine d'Alger

Cours de Microbiologie pour les étudiants de 3eme année

Tests de sensibilité des bactéries aux antibiotiques : principe et applications en antibiothérapie

Dr. N. BENAMROUCHE, Dr. F. HENNICHE

Objectifs

- Définir la bactériostase, la bactéricidie, la CMI et la CMB
- Définir l'antibiogramme
- Définir les trois catégories cliniques : S, I ou R
- Décrire succinctement les diverses méthodes de détermination de l’antibiogramme, de la CMI, de la CMB et de l’association d’antibiotiques
- Décrire le principe et l’intérêt des tests rapides
- Définir les indications des associations d’antibiotiques
- Décrire les méthodes de dosage d’antibiotique, de détermination de pouvoir bactériostatique et de pouvoir bactéricide de liquide biologique

Rappel sur les critères de prescription d'une antibiothérapie

- Avant la prescription d'un traitement antibiotique, le clinicien doit répondre à un certain nombre de questions concernant l'indication et le choix de l'antibiotique, l'utilisation d'une mono ou bithérapie, la voie d'administration à utiliser et en dernier le choix des tests microbiologiques permettant de juger de l'efficacité de l'antibiotique prescrit.

- Une prescription correcte et judicieuse doit répondre aux 4 critères énumérés ci-dessous :

Rappel sur les critères de prescription d'une antibiothérapie

Infection bactérienne

- Le clinicien s'aidera d'arguments cliniques ou cliniques et bactériologiques en se basant sur les résultats du laboratoire et notamment l'identification du germe responsable de l'infection.
- La connaissance de l'épidémiologie des agents étiologiques des infections ainsi que de leur sensibilité aux antibiotiques permettent de guider vers un choix d'antibiotique adapté.

Choix de l'antibiotique

- Doit tenir compte du germe pathogène, du foyer infectieux, de la présence d'une pathologie sous jacente (immunodépression, diabète).
- Le laboratoire intervient pour identifier le germe, apprécier sa sensibilité aux antibiotiques (antibiogramme, CMI) et étudier l'efficacité d'une antibiothérapie (dosage sérique, étude des associations d'antibiotique).

Rappel sur les critères de prescription d'une antibiothérapie

L'administration de l'antibiotique

- Les modalités d'administration des antibiotiques nécessitent des connaissances sur la pharmacocinétique des antibiotiques, doivent aussi tenir compte du type d'infection (localisée ou disséminée) et du terrain du patient.

Le suivi du traitement antibiotique

- Il est nécessaire et permet de juger de son efficacité et de sa toxicité. Le laboratoire intervient en effectuant des dosages pour juger si les doses sont toxiques comme il intervient pour juger de l'efficacité en dosant l'antibiotique et en recherchant le pouvoir bactériostatique et bactéricide d'un liquide biologique (sérum, LCR…).

Bactériostase et bactéricidie

- Les interactions bactérie-antibiotique peuvent se traduire soit par un ralentissement de la croissance bactérienne (bactériostase), soit par un effet létal de l'antibiotique (bactéricidie).

- La bactériostase est quantifiée par la CMI (concentration minimale inhibitrice) et la bactéricidie par la CMB (concentration minimale bactéricide).

Les tests de sensibilité

L’antibiogramme

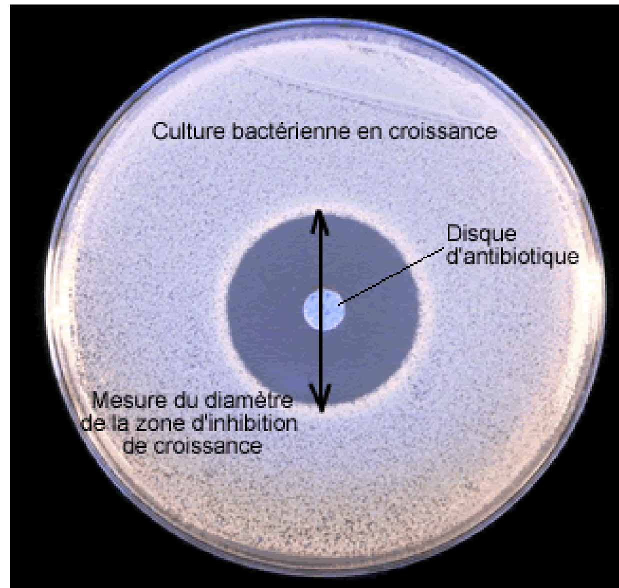
- La méthode utilisée est la méthode de diffusion en gélose avec des disques.
- Le principe du test consiste à utiliser des disques en papier buvard imprégnés d’une concentration fixe d’antibiotique.

- Ces disques sont déposés à la surface d’une gélose inoculée par une suspension bactérienne contenant une quantité fixe de bactéries (inoculum bactérien).
- Après une incubation à 35° pendant 18-24 heures, il s’établit un gradient de concentration entre la culture bactérienne et la diffusion du disque et qui s’exprime par un diamètre d’inhibition de la culture. La concentration d’antibiotique en bordure de la zone d’inhibition correspond à la CMI de l’antibiotique pour la souche étudiée.

- Le diamètre de la zone d’inhibition est mesuré en mm et des courbes de concordance diamètre-CMI sont réalisées. Ces courbes sont construites pour chaque antibiotique à partir d’échantillons représentatifs des différentes espèces bactériennes.

- Un contrôle de qualité est nécessaire (souches de référence=souches témoin). Ce contrôle permet de valider l’antibiogramme notamment la qualité du milieu et celle des disques utilisés.

Les tests de sensibilité



Antibiogramme. Méthode par diffusion,
faculté de pharmacie et de médecine de Franche-comté
acces.inrp.fr/.../index_html

Les tests de sensibilité

- La mesure de ce diamètre permet de classer la bactérie après comparaison des diamètres à une table dans 3 catégories : Sensible (S), Intermédiaire (I) ou Résistant (R).
- Ces catégorisations cliniques sont définies en comparant les résultats obtenus en CMI avec des concentrations critiques définies en fonction des concentrations sériques obtenues après des posologies usuelles. Grâce aux courbes de concordance, aux concentrations critiques correspondent des diamètres critiques.

- Sensible(S) : signifie que la probabilité de succès thérapeutique est forte, à condition que les autre paramètres pharmacologiques (diffusion au site de l'infection), toxicologique et clinique soient pris en compte.
- Résistant(R) : signifie que le risque d'échec thérapeutique est grand quelque soit le traitement.
- Intermédiaire (I) : signifie que l'action de l'antibiotique se situe dans la zone d'incertitude qui ne peut pas prédire du succès ou de l'échec thérapeutique.
- La réponse S/I/R est suffisante dans la majorité des infections.

- Les avantages de l'antibiogramme sont : sa rapidité et sa reproductibilité.
- Les inconvénients de ce test sont : l'étude de la bactériostase uniquement, le manque de précision, l'absence de détection de certaines résistances telles que certaines β-lactamases, la réponse ne tient pas compte du site de l'infection mais seulement des concentrations sériques pour des posologies usuelles et d'interprétation pouvant être complexe.

Les tests de sensibilité

Les tests rapides (mise en évidence d'une β-lactamase)

- Ce test est complémentaire à l'antibiogramme et obligatoire pour certaines espèces bactériennes (*Haemophilus*, *Neisseria gonorrohae*).
- Il est dit test à la nitrocéfine, celle-ci est une céphalosporine chromogène qui scindée par une ß-lactamase libère une substance chromogène (colorée).

- Ce test à pour principe de déposer une colonie sur un disque imprégné de nitrocéfine, lorsqu'il y a production de β-lactamase par la bactérie, il y a apparition d'une coloration rouge sur le disque. Exemple : ***Haemophilus*** et ***Neisseria gonorrhoae***.

- Ce test est complémentaire à l'antibiogramme il a l'avantage de permettre de donner une réponse rapide au clinicien.

Les tests de sensibilité



Méthodes de détection de la production de β-lactamase,
A. Philippon ; www.microbes-edu.org

Les tests de sensibilité

Techniques de diagnostic moléculaire

- Ces techniques consistent à mettre en évidence les gènes codant pour la résistance aux antibiotiques.
- Les techniques utilisées sont l'hybridation avec des sondes nucléiques ou l'amplification par PCR (polymérase chain reaction).
- Elles sont utilisées pour :

- Résistance à l'oxacilline chez *Staphylococcus aureus* par la mise en évidence du gène *mecA*
- Résistance aux glycopepetides chez *Enterococcus sp.* par la mise en évidence des gènes *vanA*, *vanB* et *vanC*.

- L'intérêt de ces techniques est la détection rapide des résistances en 3 à 4 heures, elles sont spécifiques et sensibles. Elles complètent les méthodes phénotypiques et présentent un intérêt pour les bactéries à croissance lente (exemple *Mycobacterium tuberculosis, Legionella*) ou difficilement cultivables (*Mycoplasma, Chlamydia*). Elles peuvent être appliquées directement sur les produits pathologiques et permettent d'obtenir une réponse plus rapide, notamment en cas d'infection sévère.

- Limites : elles peuvent détecter des gènes de résistance non exprimés par la bactérie. C'est-à-dire qu'on peut détecter un gène de résistance alors que la bactérie a un phénotype sensible. Elles ne permettent pas la détection de nouveaux mécanismes de résistance, à la différence de l'antibiogramme « classique » qui évalue la relation bactérie-antibiotique et qui permet de détecter un nouveau mode de résistance.

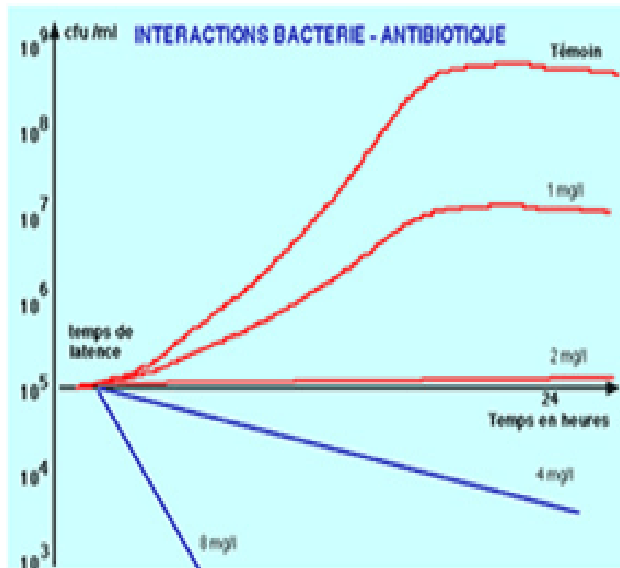
Les tests de sensibilité

Etude des concentrations minimales inhibitrices (CMI)

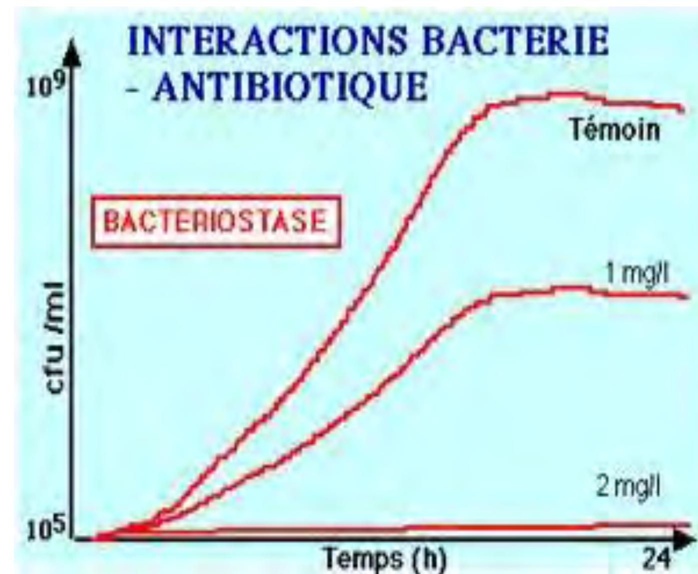
- **Méthode par dilution**
- CMI : c'est la plus faible concentration d'antibiotique qui inhibe une culture visible à l'œil. Elle définit la bactériostase.
- Principe du test : consiste à mettre un inoculum bactérien fixe (10^5 UFC/ml) dans une série de dilution de l'antibiotique (gamme de concentration en progression géométrique de raison 2). Un tube sans antibiotique servira de témoin. Elle se pratique en milieu liquide (en tubes ou en microplaques) ou en milieu solide (dans ce cas, l'antibiotique est incorporé dans la gélose ; chaque boîte de Petri correspond à une concentration donnée d'antibiotique ; il est possible de tester plusieurs souches déposées sous forme de spot sur la même série de boîtes).
- La CMI est déterminée puis comparée à un tableau pour classer la bactérie dans l'une des catégories S, I ou R.

- Avantage : technique précise, donne un résultat quantitatif en mg/l ou en µg/ml. Utile pour les antibiotiques ayant les meilleures CMI dans les infections sévères ou quand les foyers infectieux sont peu accessibles.
- Inconvénient : technique longue, lourde et coûteuse.

Les tests de sensibilité

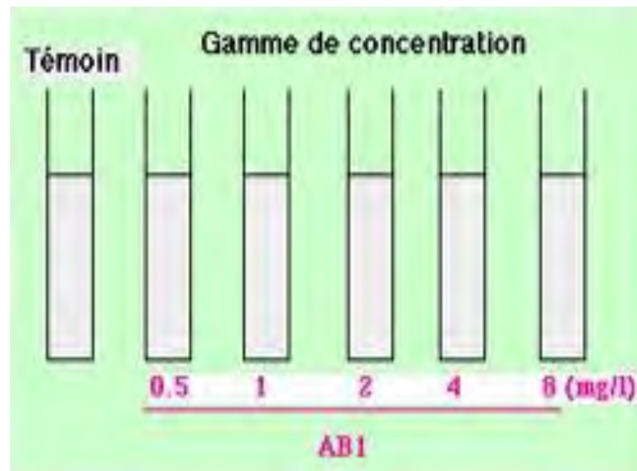


Interaction bactérie-hôte : antibiotique, A. Philippon ; www.microbes-edu.org

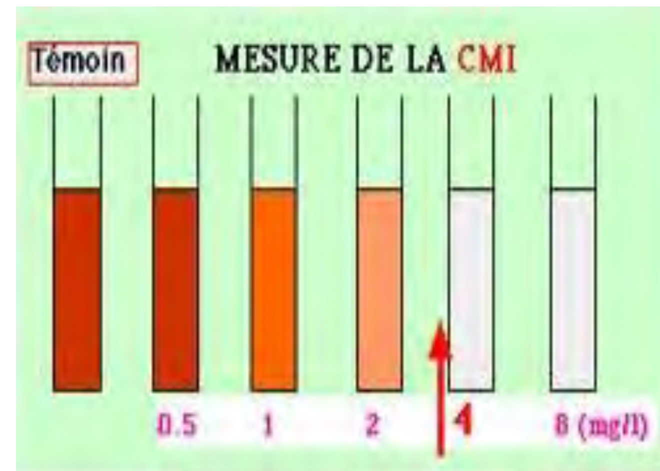


Interaction bactérie-hôte : bactériostase, A. Philippon ; www.microbes-edu.org

Les tests de sensibilité



Gamme de concentration



Détermination de la CMI par dilution en milieu liquide

A. Philippon, www.microbes-edu.org

Les tests de sensibilité

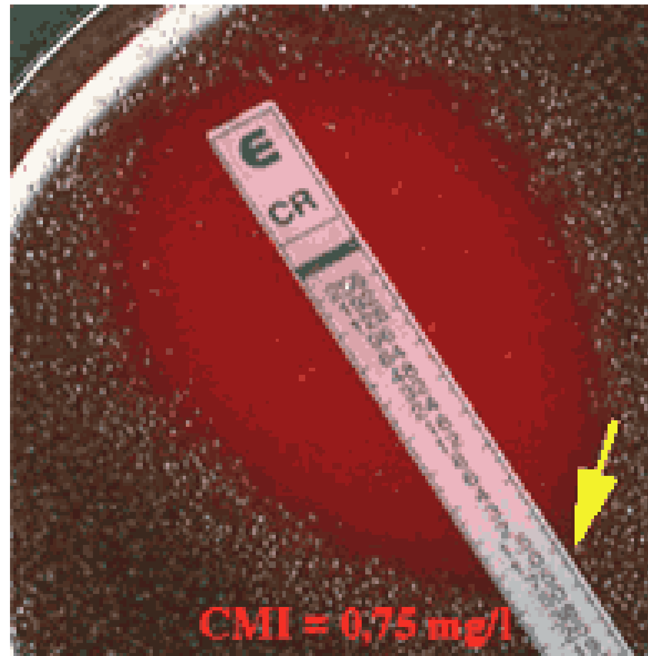
- **Méthode par diffusion**

- Pour alléger cette technique, de fines bandelettes de plastique inerte et non poreux imprégnées d'un gradient prédéfini de concentrations croissantes d'antibiotique sont utilisées. Les bandelettes E-Tests® (bioMérieux) et MICE® Tests (Oxoid) sont commercialisées. La technique d'ensemencement est identique à celle de l'antibiogramme.
- La bandelette est mise sur la surface de la gélose. Après une incubation à 35° pendant 18-24 heures, une ellipse d'inhibition symétrique centrée le long de la bandelette se forme. La lecture de la CMI est effectuée au point d'intersection de l'ellipse d'inhibition et de la bandelette.

- Intérêt : infections sévères ou pour certains germes tels *Streptococcus pneumoniae,* étude de la sensibilité des staphylocoques et entérocoques aux glycopeptides, germes à croissance lente, etc.

- Avantages : CMI plus précise qu'avec les disques.
- Inconvénient : coût élevé.

Les tests de sensibilité



E-test,
A. Philippon ; www.microbes-edu.org

Les tests de sensibilité

- **Détermination automatisée de la CMI**
- Certains automates utilisés pour l'étude de la sensibilité aux antibiotiques rendent des résultats en CMI. Des galeries contenant une gamme de concentration par antibiotique sont inoculées avec une suspension de la bactérie à étudier.

- Après incubation dan l'automate, des CMI seront déterminées. Trois automates permettent de déterminer les CMI : le Phoenix (Becton Dickinson), le Vitek 2 (bioMérieux) et le Microscan (Siemens).

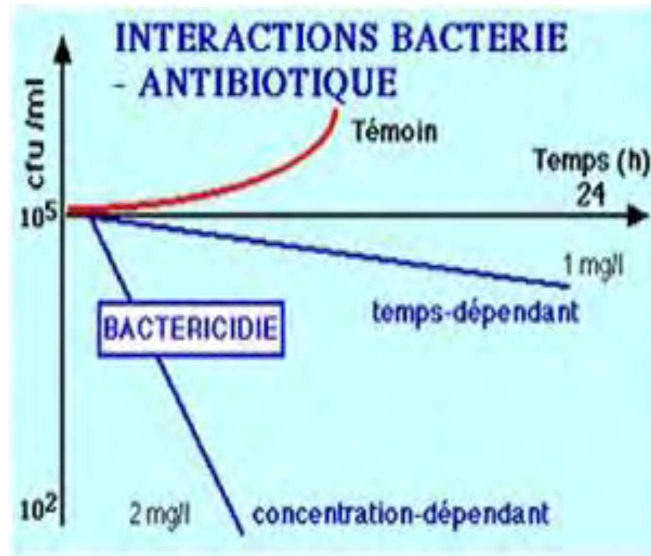
Les tests de sensibilité

Etude de la concentration minimale bactéricide (CMB)

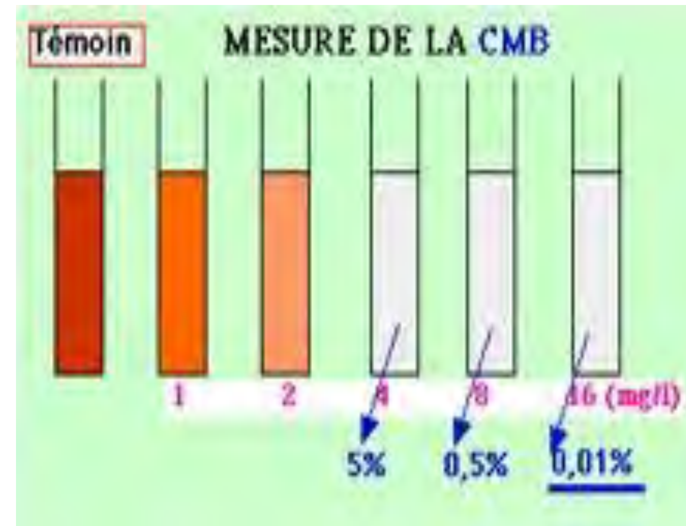
- **CMB**
- La CMB est la plus faible concentration de l'antibiotique bactéricide c'est-à-dire qui lyse les bactéries (≤0,01% de survivants). Elle définit la bactéricidie.
- Principe du test : consiste à dénombrer le nombre de bactéries survivantes à partir de la dilution de l'antibiotique correspondant à la CMI.
- Une gamme de concentration d'antibiotique est réalisée comme pour la détermination de la CMI. Le même jour, une numération de l'inoculum de départ (tube témoin sans antibiotique) est effectuée en réalisant 4 dilutions de 10 en 10 qui seront chacune ensemencées en strie sur une gélose. Après incubation à 35°C pendant 18 h, les colonies seront dénombrées et le nombre d'UFC (unité formant colonie) à la dilution 1/10000 correspondra à 0,01% de l'inoculum de départ. Après 18 h d'incubation à 35°C, tous les tubes qui ont une concentration d'antibiotique ≥ à la CMI seront repiqués sur gélose en stries. Après 18 h d'incubation à 35°C, les colonies présentes sur chaque strie sont comptées et comparées à la numération de l'inoculum de départ. La CMB est la plus faible concentration d'antibiotique pour laquelle le nombre de colonies bactériennes est ≤ au nombre de colonies présentes sur la dilution de l'inoculum de départ (≤0,01%).

- Un antibiotique est dit bactéricide lorsque la valeur de sa CMB est proche de celle de la CMI (rapport CMB/CMI <2).
- Un rapport CMB/CMI >32 indique que l'antibiotique est bactériostatique ou s'il s'agit d'un antibiotique habituellement considéré comme bactéricide ; la souche est dite tolérante.
- Indication : infection grave telle que l'endocardite infectieuse.

Les tests de sensibilité



Interaction bactérie-hôte : bactéricidie,
A. Philippon ; www.microbes-edu.org



Détermination de la CMB par dilution,
A. Philippon ; www.microbes-edu.org

Les tests de sensibilité

- **Cinétique de bactéricidie**
- Consiste en un dénombrement dynamique au cours du temps de bactéries survivantes à partir de bouillons contenant l'antibiotique à étudier.

- Inconvénients : méthode lourde.

Etude des associations des antibiotiques

- Une association d'antibiotiques est indiquée pour :

- Elargir le spectre.
- Obtenir une synergie.
- Augmenter l'effet bactéricide lors d'infections sévères (endocardites, bactériémies, arthrites, infections sur matériel…).
- Couvrir une infection polymicrobienne.
- Les infections à bactérie multirésistante (BMR).
- Eviter l'apparition de mutants résistants.
- diminuer la durée de traitement.

Les tests de sensibilité

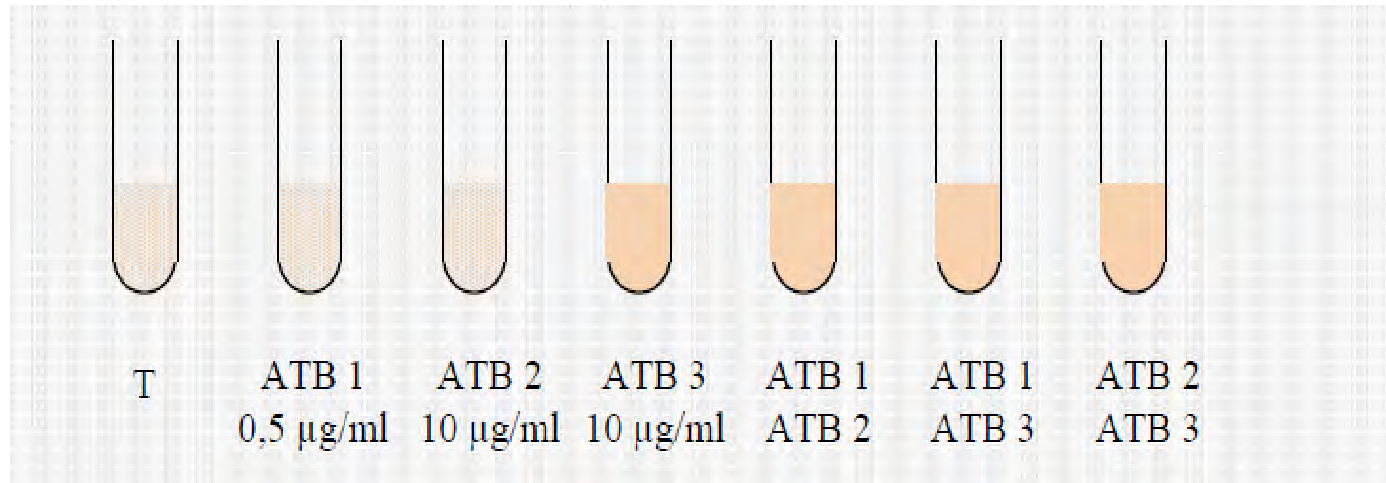
- **Pouvoir bactéricide et cinétique de bactéricidie des associations**

- Principe :
- Méthode en milieu liquide utilisant des disques d'antibiotiques de charge connue. Ces antibiotiques sont testés sur la bactérie responsable de l'infection.
- Association de plusieurs antibiotiques 2 à 2, plusieurs associations d'antibiotiques sont testées y compris l'association avec laquelle le patient est traité.
- L'inoculum bactérien est calibré et est ensemencé dans chaque tube contenant l'association des antibiotiques.
- Tous les tubes sont incubés pendant 18H, avec des repiquages sur milieu solide après 2H, 4H, 6H et 18H.
- Ces différents milieux solides sont incubés pendant 18H. Ensuite on procède à la numération des bactéries survivantes. Un inoculum témoin est utilisé.
- Une association est dite bactéricide si le nombre de bactéries survivantes est ≤ à 0,01% de l'inoculum de départ. Elle est précoce si la bactéricidie est observée à partir de 2H.
- Une association est dite synergique si le nombre de bactéries survivantes est < à 0,01% de l'inoculum de départ.

Les tests de sensibilité

J0 : Gamme étalon (100; 10; 1; 0.1; 0.01 %), ensemencement, incubation.

J0 : Incubation avec les ATB seuls et associés 2 à 2.



Pouvoir bactéricide des associations (suspensions de la souche à tester avec antibiotiques seuls et associés),
Didier Hocquet ; rôle du laboratoire dans la conduite et la surveillance d'une antibiothérapie

Les tests de sensibilité

J1 : ensemencement des bouillons, incubation
J2 : comparaison avec les témoins

Gamme étalon
100%
10%
1%
0.1%
0.01%

Résultats
Oxa
Rif
Vanco
Gm
Oflo
Vanco + Gm
Vanco + Rif

Résultats : OXA – 100 % ; Vanco et Gm – 10 % ; Rif et oflo < 0.01 % : **Vanco + Gm ou Rif < 0.01 %**

Pouvoir bactéricide des associations (repiquage sur gélose),
Didier Hocquet ; rôle du laboratoire dans la conduite et la surveillance d'une antibiothérapie

Les tests de sensibilité

- Interprétation :

- L'association est dite **synergique** lorsque l'effet des deux antibiotiques est **supérieur** à celui de l'antibiotique utilisé seul.
- Elle est **antagoniste** lorsque son effet est **inférieur** à celui de l'antibiotique utilisé seul.
- Elle est **indifférente** lorsque son effet est **égal** à celui de l'antibiotique utilisé seul.

- Intérêt :
- Permet de suivre l'efficacité de l'association d'antibiotique utilisée et d'étudier l'association d'antibiotique la plus efficace pour le traitement du malade.

- Avantages :
- Pertinence du test : moyennement reproductible. Bonne corrélation avec l'efficacité des antibiotiques *in vivo,* appréciation de la bactéricidie quantitative et de la vitesse de bactéricidie.

- Limites : surestime l'effet des antibiotiques sur les bactéries fragiles. Contraintes techniques (souche du malade, rigueur et temps), absence de standardisation.

Les tests de sensibilité

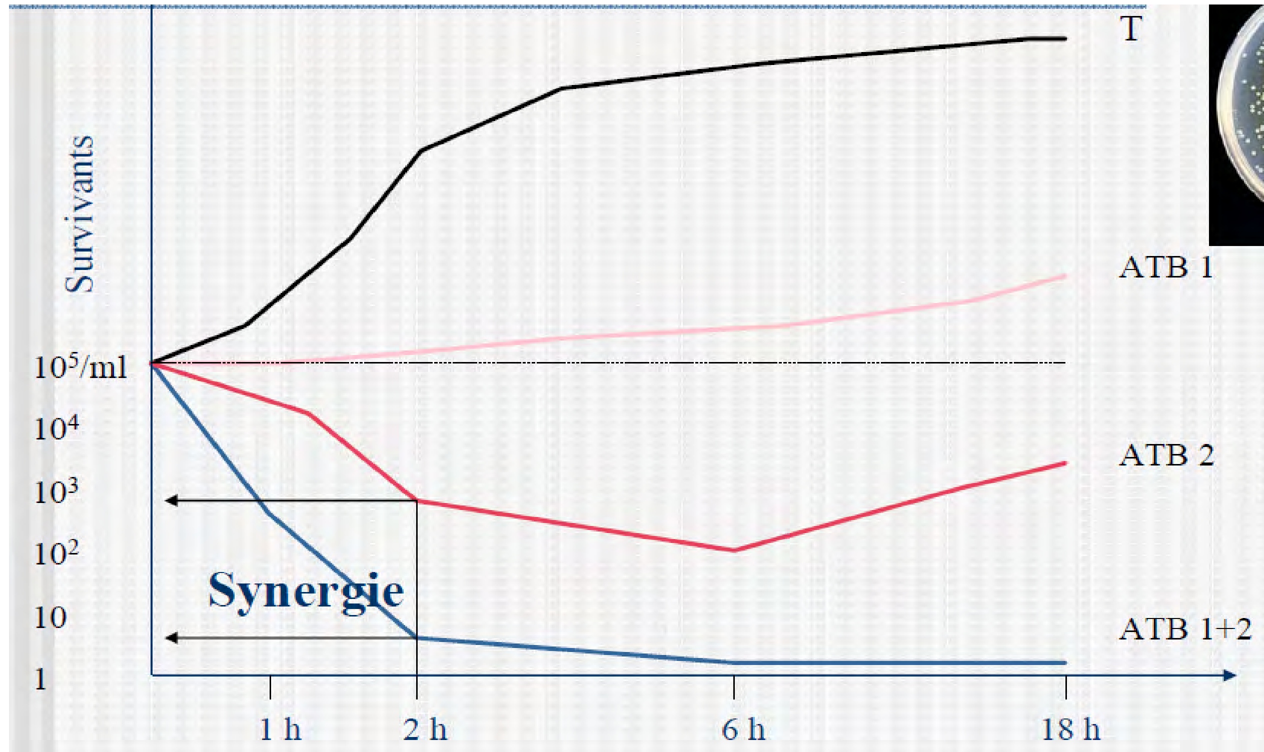
- **Cinétique de bactéricidie des associations**
- Principe :
- Consiste à dénombrer le nombre de survivants au cours du temps dans un bouillon contenant un ou plusieurs antibiotiques.

- Intérêt :
- Infections sévères à bactéries multirésistantes (BMR).

- Avantages : appréciation de la bactéricidie quantitative et de la vitesse de bactéricidie.
- Limites : absence de standardisation.

- Interprétation :
- Synergie si nombre de survivants avec l'association est $\leq 2 \log_{10}$.
- au nombre obtenu avec l'un ou l'autre des 2 antibiotiques.

Les tests de sensibilité



Cinétique de bactéricidie des associations,
Didier Hocquet ; rôle du laboratoire dans la conduite et la surveillance d'une antibiothérapie

Les tests de suivi

Le dosage de l'antibiotique dans le sérum

- Intérêt :
- Apprécier le risque toxique d'un antibiotique ayant un index thérapeutique étroit c'est-à-dire que la dose efficace est proche de la dose toxique, exemple : aminosides et glycopeptides.
- Surveiller et prédire l'efficacité d'une thérapeutique.

- dosage de la teicoplanine « à la vallée ».
- adapter les posologies des antibiotiques toxiques.

- Vérifier la compliance des patients.

- Principe du test : on effectue deux prélèvements de sérum le 1er au pic de la plus forte concentration sérique (entre 1 et 2 h après injection) et le 2eme à la vallée au moment de l'élimination de l'antibiotique (avant une nouvelle injection).
- Méthodes très diverses (microbiologiques, HPLC, immuno-enzymatiques…)
- Pour être actif, la concentration locale de l'antibiotique doit être >CMI.

Les tests de suivi

Interprétation

	Pic (mg/l)	Vallée (mg/l)
Gentamicine	5-10	< 2
Tobramycine	5-10	< 2
Amikacine	20-25	< 10
Vancomycine	30-40	< 10
Teicoplanine	-	10-20

Applications :

Surveillance de la toxicité : doit être en routine de l'utilisation des aminoglycosides et des glycopeptides.

Foyers où les antibiotiques ne diffusent pas ou peu : foyers enkystés, collection purulente (anaérobiose et acidité pour les aminosides).

Les tests de suivi

Le pouvoir bactériostatique d'un liquide biologique

- Indiqué pour apprécier l'efficacité d'un traitement d'infection sévère ou compliquée et se pratique le plus souvent sur le sérum.
- Il est nécessaire d'avoir la souche responsable de l'infection.
- Principe du test : consiste à mettre en contact différentes dilutions du sérum avec un inoculum de la bactérie pathogène responsable de l'infection. On note la dernière dilution où il n'y a pas de croissance bactérienne.

- L'effet bactériostatique est valable si la plus grande dilution est ≥1/16ème ou 1/32ème .

Les tests de suivi

Le pouvoir bactéricide d'un liquide biologique

- Consiste à dénombrer les bactéries survivantes à partir de la dernière dilution du pouvoir bactériostatique et permet de noter si le sérum est suffisamment bactéricide.
- L'effet bactéricide est valable si la plus grande dilution est ≥1/8ème .

En conclusion, importance de la communication clinicien-microbiologiste pour la transmission des résultats et dans le choix des analyses

Références bibliographiques

1. Courvalin P, Leclercq R. Antibiogramme. Paris : *ESKA* ; 2012.
2. Courvalin P. Bactéricidie : aspects théoriques et thérapeutiques. Paris : Maloine ; 1990.
3. F. Denis, MC. Ploy, C. Martin, E. Bingen, R. Quentin. Bactériologie Médicale Techniques usuelles. Paris : Elsevier/Masson; 2011.
4. Site de microbiologie médicale. www.microbes-edu.org.